

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2005年6月30日 (30.06.2005)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2005/059153 A1

(51) 国际分类号⁷: C12P 7/62, C08G 63/66 // (C12P 7/62,
C12R 1:05, 1:38)

(21) 国际申请号: PCT/CN2003/001092

(22) 国际申请日: 2003年12月19日 (19.12.2003)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 宁波天安生物
材料有限公司(TIANAN BIOLOGIC MATERIAL
CO., LTD. NINGBO) [CN/CN]; 中国浙江省宁波市北
仑大港六路68号, Zhejiang 315800 (CN).

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 陈学军(CHEN, Xuejun)
[CN/CN]; 中国浙江省宁波市北仑大港六路68号,
Zhejiang 315800 (CN).

(74) 代理人: 上海隆天新高专利商标代理有限公司
(LUNGTING SINKO IP ATTORNEYS, LTD.); 中国
上海市复兴中路1号申能国际大厦1401-1402室,
Shanghai 200021 (CN).

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,

DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(BW, GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES,
FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人在国际申请日有权申请并被授予专利(细则
4.17(ii))对除美国以外的所有指定国
- 发明人资格(细则4.17(iv))仅对美国

本国际公布:

- 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期
PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A METHOD FOR SEPARATING, EXTRACTING AND PURIFYING POLY- β -HYDROXYALKANOATES
(PHAs) DIRECTLY FROM BACTERIAL FERMENTED BROTH

(54) 发明名称: 从细菌发酵液中直接分离提纯胞内聚羟基脂肪酸酯的方法

(57) Abstract: The invention discloses a method for separating, extracting and purifying poly- β -hydroxyalkanoates (PHAs) directly from bacterial fermented broth, which technical field is biotechnological downstream successive treatment. The method of the invention comprising steps of: physical crushing pretreatment of the bacterial fermented broth; conditioning PH of the bacterial fermented broth to alkalinity, adding anionic surfactant and agitating reaction liquid; separating and extracting precipitation; washing and drying. The process of the invention is simple, cheap, high yield and no pollution, and can realize large scale industrial production.

(57) 摘要

本发明公开了一种从细菌发酵液中直接分离提纯胞内聚羟基脂肪酸酯的方法, 属于生物工程下游后处理技术领域。本发明方法包括如下步骤: 用物理方法对发酵液进行细胞破壁预处理; 将经预处理的发酵液 pH 值调节至碱性; 加入阴离子表面活性剂, 搅拌反应; 分离提取反应液中的沉淀; 及洗涤、干燥。本发明工艺简单、成本低、提取收率高, 无污染, 能够实现大规模工业化生产。

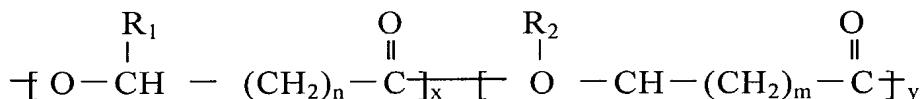
从细菌发酵液中直接分离提纯胞内聚羟基脂肪酸酯的方法

技术领域

本发明属于生物工程下游后处理技术领域，具体涉及细菌发酵产物的提取分离，更具体涉及胞内聚羟基脂肪酸酯的直接提取分离方法。

发明背景

聚- β -羟基脂肪酸酯 (Poly- β -Hydroxyalkanoates, 简称 PHAs) 是一类由特定微生物在特殊的生长条件下在胞内积累的生物聚酯，PHAs 的通式为：



其中，n,m 为 1—4 的整数，通常为 1，即 3—羟基脂肪酸 (3-HAs)；R₁、R₂ 为取代或未取代的饱和或不饱和的直链或支链 C₁₋₁₂ 烷基；X、Y 不能同时为 0，X、Y 的大小决定了该组份在共聚物中的含量。一般，PHAs 的重均分子量在 100—400 万 Da 之间。

PHAs 的物理性质类似于聚丙烯，但由于它具有生物降解性、生物相容性、压电性、光学活性等普通石油化工树脂所不具备的特性，因此在工业、农业、医学、卫生、食品、电子等领域具有广阔的应用前景。

目前国际上 PHAs 的大规模工业化生产仍未实现，其主要原因是成本较石油化工树脂高得多。PHAs 成本主要包括原料成本和分离提纯成本。原料成本的高低取决于菌种的生产效率及所采用的发酵工艺，而分离提纯成本则主要取决于采用的工艺。目前的提取工艺是首先采用高速离心机将细胞从发酵液中分离出来，再对分离后的湿菌体中的 PHAs 进行提纯，一般采用的提纯方法是有机溶剂萃取法、化学试剂法、表面活性剂+酶法等。这些方法或是成本高、或是污染严重，难以实现

工业化生产。公开号 CN1328160A 的发明专利申请公开了一种从含有聚羟基烷酸酯的细胞发酵液中直接提取聚羟基烷酸酯的一步提取分离方法。但该方法必须采用大量的次氯酸钠，使操作环境恶劣、污染严重，由于废水处理而增加成本，并且对提取产物 PHAs 的分子量有极大的剪切降解作用，影响产品品质。

因此，本发明的目的是提供一种可以有效降低分离提纯成本、减少污染、适合于工业化生产的 PHAs 提取方法。

发明内容

本发明提供一种从细菌发酵液中直接分离提纯胞内聚羟基脂肪酸酯的方法。本发明的方法包括以下步骤：

- (1) 用物理方法对发酵液进行细胞破壁预处理；
- (2) 将经预处理的发酵液 pH 值调节至碱性；
- (3) 加入阴离子表面活性剂，搅拌；
- (4) 分离提取反应液中的沉淀；
- (5) 洗涤、干燥，

其中，调节 pH 和加入表面活性剂的顺序可以互换。

步骤 (3) 中除了加入阴离子表面活性剂外还可加入凝聚剂。

本发明方法中，细胞破壁所用的物理方法可以是超声波破碎、珠20 磨机研磨或高压处理。

预处理后的发酵液 pH 调节在 8~13。调节 pH 所用的碱性物质可以是 NaOH、Na₂CO₃、NaHCO₃ 等固体或水溶液或氨水等。

本发明所用的阴离子表面活性剂可以是烯基磺酸盐 (AOS)、脂肪醇硫酸盐、脂肪醇聚氧乙烯醚硫酸盐 (AES)、脂肪醇聚氧乙烯醚25 (AEO)、烷基酚聚氧乙烯醚等，其用量为发酵液的 0.5%~20% (W/V)。

本发明方法中可以加的凝聚剂有聚丙烯酸钠、变性淀粉、聚胺等。凝聚剂的用量为发酵液的 0.5%~20% (W/V)。

加入阴离子表面活性剂和凝聚剂后搅拌反应的温度在 10℃~70

℃，反应时间为 5~60 分钟。

分离提取反应液中沉淀的方法可以采用离心、压滤、真空抽滤等。

本发明适用处理对象广泛，可应用于各种含聚羟基脂肪酸酯的细菌及其变异株及基因工程菌等发酵液的分离提纯。所适用的细菌种属
5 主要包括：产碱杆菌属 (Alcaligenes)、假单胞菌属 (Pseudomonas)、
固氮菌属 (Azotobacter)、红螺菌属 (Rhodospirillum)、甲基营养菌
属 (Methylotrophs) 和芽孢杆菌属 (Bacillus) 等。

本发明方法对发酵液中细胞干重及其中的 PHAs 含量的要求不高。

本发明工艺简单、成本低、提取收率高。并且大大减少污染，从而能
10 够实现大规模工业化生产。

具体实施方式

下面用实施例对本发明作进一步描述，但这些实施例并不构成对
权利要求范围的任何限制。本领域技术人员在得到本说明书的揭示后
15 对本发明所作的任何修改和变动都将落在本说明书所附权利要求的
范围内。

实施例 1

取 *Alcaligenes entrophus* 突变株 65-7 的发酵液 1000ml，细
20 胞干重为 142 克/升，PHBV 含量 78.5%，用珠磨机 (530 转/分，0.1mm
钢珠) 预处理 40 分钟，用 30% 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 12，加入
13 克十二烷基硫酸钠，调节反应温度至 32℃，搅拌反应 5 分钟，用
滤纸抽滤，所得沉淀用水洗涤至洗液呈中性，70℃左右烘干至恒重。
所得产品纯度为 98.2%，重均分子量 5.2×10^5 Da，提取收率 85.2%。抽
25 滤的废水经厌氧、好氧处理后，其 COD、BOD 分别达到 800mg/l 和
30mg/l，达到国家排放标准。

实施例 2

取 *Alcaligenes entrophus* 菌发酵液 100ml, 细胞干重 147g/1 (其中 PHBV 含量为 75. 2%) , 用超声波 (功率 1500W) 破壁 20 分钟, 用 30%NaOH 溶液调节 pH 值至 8, 加入 0. 5g 十二烷基硫酸钠和 5g 聚丙烯酸钠, 调节反应温度至 70℃, 搅拌反应 30 分钟。然后, 用滤纸抽滤, 将所得沉淀用水洗涤, 洗涤至洗液呈 pH 中性后置于 70℃左右烘箱内干燥至恒重。所得产品纯度 93. 2%, 分子量 4.1×10^5 Da, 提取收率 80. 3%。

10 实施例 3

取 *Alcaligenes entrophus* 菌发酵液 50ml, 细胞干重 102g/1 (其中 PHB 含量为 60%) , 用珠磨机 (560 转/分, 0.1mm 钢珠) 破壁预处理 30 分钟, 用 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶液调节 pH 值至 13, 加入 10g 十二烷基硫酸钠和 10g 变性淀粉, 调节反应温度至 10℃, 搅拌反应 10 分钟, 用离心机 (分离因素为 600) 分离, 将所得沉淀用水洗涤, 洗涤至洗液呈中性后置于 70℃左右烘箱内干燥至恒重。所得产品纯度 98. 2%, 分子量 4.4×10^5 Da, 提取收率 87%。

实施例 4

20 取 *Alcaligenes entrophus* 突变株 65-7 的发酵液 500ml, 细胞干重为 135 克/升, PHB 含量 75. 5%, 将其置入特制容器中, 升压至 60Mpa, 10 分钟后快速释放压力, 收集液体后重复 2 遍。处理后的发酵液用 30% 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 10, 加入 9 克十二醇聚氧乙烯醚硫酸钠, 调节反应温度至 38℃, 搅拌反应 8 分钟, 用滤纸抽滤, 所得沉淀用水洗涤至洗液呈中性, 70℃左右烘干至恒重。所得产品纯度为 96. 7%, 重均分子量 4.2×10^5 Da, 提取收率 81. 5%。

实施例 5

取 *Alcaligenes entrophus* 菌发酵液 100L, 细胞干重 154g/1 (其

中 PHBV 含量为 80.5%），用超声波（功率 2800W，连续处理）破壁 40 分钟，用 30%NaOH 溶液调节 pH 值至 11，加入 10 kg 十二烷基硫酸钠和 0.5kg 聚丙烯酸钠，调节反应温度至 50℃，搅拌反应 60 分钟，用压滤机压滤，将所得沉淀用水洗涤，洗涤至洗液呈 pH 中性后置于 70 5 ℃左右烘箱内干燥至恒重。所得产品纯度 97%，分子量 5.3×10^5 Da，提取收率 84%。

实施例 6

取 *Pseudomonas* 菌的发酵液 100ml，细胞干重为 86 克/升，PHBV 10 含量 61.5%，用珠磨机（560 转/分，0.1mm 钢珠）预处理 50 分钟，用 30% 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 11，加入 3 克十二烷基硫酸钠，调节反应温度至 24℃，搅拌反应 10 分钟，用滤纸抽滤，所得沉淀用水洗涤至洗液呈中性，70℃左右烘干至恒重。所得产品纯度为 94.2%，重均分子量 3.2×10^5 Da，提取收率 71.2%。

权 利 要 求 书

1. 从细菌发酵液中直接分离提纯胞内聚羟基脂肪酸酯的方法，其特征在于包括以下步骤：

5 (1) 用物理方法对发酵液进行细胞破壁预处理；
(2) 将经预处理的发酵液 pH 值调节至碱性；
(3) 加入阴离子表面活性剂，搅拌反应；
(4) 分离提取反应液中的沉淀；
(5) 洗涤、干燥，

10 其中，调节 pH 和加入表面活性剂的顺序可以互换。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中步骤 (3) 还可加入凝聚剂。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述所述物理方法选自超声波粉碎、珠磨机研磨和高压处理。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中预处理后的发酵液 pH 调节在
15 8~13。

5. 如权利要求 1 或 4 所述的方法，其中调节 pH 所用的碱性物质选自 NaOH、Na₂CO₃、NaHCO₃ 固体/水溶液和氨水。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述阴离子表面活性剂选自
20 烯基磺酸盐、脂肪醇硫酸盐、脂肪醇聚氧乙烯醚硫酸盐、脂肪醇聚氧
乙烯醚和烷基酚聚氧乙烯醚，其用量为发酵液的 0.5%~20% (W/V)。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述凝聚剂选自聚丙烯酸钠、
变性淀粉和聚胺，其用量为发酵液的 0.5%~20% (W/V)。

8. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述搅拌反应的温度在 10℃~
70℃，时间为 5~60 分钟。

25 9. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述分离提取反应液中沉淀
的方法选自离心、压滤和真空抽滤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

pct/cn03/01092

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C12P7/62,C08G63/66 //C12P7/62,C12R1:05 C12R1:38

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P C08G

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI,EPODOC,PAJ,CNPAT,NPL,CNKI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN1190674A 19.AUG.1998(19.08.98) Claims 1-5 pages1,2 examples1-3	1-9
X	CN1328160A 26.DEC.2001(26.12.01) Claims1-8 pages1-2 examples1-4	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
- “L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16.JAN.2004(16.01.04)

Date of mailing of the international search report

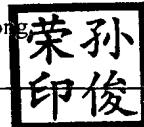
04 · MAR 2004 (04 · 03 · 2004)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

SUN,Junrong

Telephone No. 86-10-62085056



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN03/01092

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN1171410A 28.JAN.1998(28.01.98) See claims	1-9
Y	US5391708A(EASTMAN CHEMICAL COMPANY) 21.FEB.1995(21.02.95) Colum 9 line 35-Colum 11 line 7	1-9
Y	CHOI,Jong-il et al "Efficient economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant Escherichia coli by simple digestion with chemicals." 62(5),1999 546-553 All the document	1-9
Y	US4910145A(IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 20.MAR.1990(20.03.90) Colum6 line5-colum7 line55	1-9
Y	JP2001046094A(KANEKA FUCHI CHEM IND CO LTD) 20.FEB.2001(20.02.01) Abstract	1-9
Y	JP2001057895A(KANEKA FUCHI CHEM IND CO LTD) 06.MAR.2001(06.03.01) Abstract	1-9
EX	CN1464063A 31.DEM.2003(31.12.03) All the document	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/CN03/01092	
---	--

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN11190674A	19.08.98	CN1070534B	05.09.01
US5391708A	21.02.95	WO9400506A CA2138034AC US5281691A MX9303692A JP8500131T EP0909789A DE69326341D AT184294T ES2135482T DK648238T GR3031600T	06.01.94 06.01.94 25.01.94 31.01.94 09.01.96 21.04.99 14.10.99 15.09.99 01.11.99 20.12.99 31.01.00
US4910145A	20.03.90	CA1320164A DE3477271D JP1776982C EO0145233	13.07.93 28.07.88 28.07.93 19.06.85

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN03/01092

A. 主题的分类

IPC⁷ C12P7/62, C08G63/66//(C12P7/62, C12R1:05 C12R1:38)

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

C12P C08G

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT, NPL, CNKI

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
X	CN1190674 A(清华大学) 1998 年 8 月 19 日 (19.08.98) 权利要求 1—5, 说明书 1 页 18 行—2 页 13 行, 实施例 1—3	1—9
X	CN1328160A(中国科学院微生物研究所) 2001 年 12 月 26 日 (26.12.01) 权利要求 1—8, 说明书 1 页 27 行—2 页 17 行, 实施例 1—4	1—9

 其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

“L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

16.01 月 2004(16.01.04)

国际检索报告邮寄日期

04·3月 2004 (04·03·2004)

国际检索单位名称和邮寄地址

ISA/CN
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

受权官员

电话号码: 86-10-62085056

C(续). 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
Y	CN1171410A(无锡轻工大学) 1998年1月28日(28.01.98) 权利要求书	1-9
Y	US5391708A(EASTMAN CHEMICAL COMPANY) 1995年2月21日(21.02.95) 说明书9栏35行-11栏7行	1-9
Y	Choi,Jong-Il 等: "efficient economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant Escherichia coli by simple digestion with chemicals." ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY 1999年62卷第5期, 546-553 全文	1-9
Y	US4910145A(IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 1990年3月20日(20.03.90) 说明书6栏5行-7栏55行	1-9
Y	JP2001046094A(KANEKA FUCHI CHEM IND CO LTD) 2001年2月20日(20.02.01) 摘要	1-9
Y	JP2001057895A(KANEKA FUCHI CHEM IND CO LTD) 2001年3月6日(06.03.01) 摘要	1-9
EX	CN1464063A 2003年12月31日(31.12.03) 全文	1-9

国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN03/01092

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
CN1190674A	19.08.98	CN1070534B	05.09.01
US5391708A	21.02.95	WO9400506A	06.01.94
		CA2138034AC	06.01.94
		US5281691A	25.01.94
		MX9303692A	31.01.94
		JP8500131T	09.01.96
		EP0909789A	21.04.99
		DE69326341D	14.10.99
		AT184294T	15.09.99
		ES2135482T	01.11.99
		DK648238T	20.12.99
		GR3031600T	31.01.00
US4910145A	20.03.90	CA1320164A	13.07.93
		DE3477271D	28.07.88
		JP1776982C	28.07.93
		EO0145233	19.06.85